

Antisense oligonucleotides specific for protein kinase C isoforms

Publication number: DE19740384
Publication date: 1999-03-11
Inventor: HALLER HERMANN PROF (DE)
Applicant: MAX DELBRUECK CENTRUM (DE)
Classification:
- international: C12N15/11; A61K38/00; C12N15/11; A61K38/00; (IPC1-7): C07H21/04; A61K31/70; A61K48/00
- european: C12N15/11B5
Application number: DE19971040384 19970908
Priority number(s): DE19971040384 19970908

[Report a data error here](#)

Abstract of DE19740384

Antisense DNA oligonucleotides specific for protein kinase C (PKC) isoforms are new.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 197 40 384 A 1**

⑤1 Int. Cl.⁶:
C 07 H 21/04
A 61 K 31/70
A 61 K 48/00

⑳ Aktenzeichen: 197 40 384.0
㉔ Anmeldetag: 8. 9. 97
㉔3 Offenlegungstag: 11. 3. 99

①

DE 197 40 384 A 1

㉔1 Anmelder:
Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin,
13125 Berlin, DE

㉔2 Erfinder:
Haller, Hermann, Prof., 12161 Berlin, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

⑤4 Antisense Oligodesoxynukleotide (ODN) gegen Proteinkinase C (PKC)-Isoformen, ihre Verwendung und pharmazeutische Zubereitungen dieser ODN

DE 197 40 384 A 1

Die Erfindung betrifft spezifische Antisense Oligodesoxynukleotide (ODN) gegen Proteinkinase C (PKC)-Isoformen zur Behebung und/oder Vermeidung von endothelialen Barrierendysfunktionen, insbesondere betrifft es Antisense Oligodesoxynukleotide, die gegen die 3' untranslatierte Region des PKC alpha-, delta-, epsilon- und zeta-Isoform gerichtet sind. Gegenstand der Erfindung sind fernerhin die Verwendung dieser Antisense Oligodesoxynukleotide sowie pharmazeutische Zubereitungen, die diese Antisense Oligodesoxynukleotide enthalten.

Es ist bekannt, daß die Aktivierung des PKC-Systems durch Hyperglykämie eine wichtige Ursache sein kann, durch welche ungünstige Effekte bei Diabetes Erkrankungen initiiert werden (deRubertis FR und Craven PA Activation of protein kinase C in glomerular cells in diabetes. Mechanism and potential links to the pathogenesis of diabetic glomerulopathy. Diabetes 1994; 43: 1-8). Darüber hinaus ist beschrieben, daß eine PKC Aktivierung in endothelialen Zellen zu einer Verminderung in der endothelialen Zelldurchlässigkeit führt.

PKC ist kein einzelnes Enzym, sondern es besteht aus verschiedenen eindeutigen Isoformen, welche unterschiedliche enzymatische Eigenschaften und Funktionen haben (Weinstein IB. The roles of specific isoforms of protein kinase C in growth control and human colon cancer. Princess Takamatsu Symp 1991; 22: 277-83).

Die bekannten Isoformen sind in drei große Familien in Abhängigkeit von ihren regulatorischen Eigenschaften eingeteilt. Die Isoformen der Gruppe I (α , β I, β II, γ) sind für ihre Aktivierung von Calcium und DAG (1,2-Diacyl-sn-glycerol) abhängig. Gruppe II (δ -, ϵ -, θ -Isoformen) werden einzig und allein aktiviert durch DAG, während die Funktion der Isoformen der Gruppe III (ζ und λ) unabhängig von Calciumionen oder DAG für eine Aktivierung sind (Haller H, Lindschau C, Luft FC, Role of protein kinase C in intracellular signaling. Ann NY Acad. Sci 1994; 733: 313-324).

Unklar ist jedoch, welche der PKC-Isoformen durch hohe Glukosekonzentrationen aktiviert werden und welche für die Übermittlung der zellulären Effekte der Hyperglykämie verantwortlich sind. Die Mechanismen der verminderten endothelialen Zelldurchlässigkeit sind unklar.

Der Erfindung lag die Aufgabe zugrunde, diese Mechanismen aufzuklären und Substanzen für eine Therapie und/oder Prophylaxe zu finden.

Es wurde nunmehr gefunden, daß hohe extrazelluläre Glukosekonzentrationen zu einer rapiden dosis-unabhängigen Verminderung in der endothelialen Zelldurchlässigkeit über eindeutig zuordenbare PKC-Isoformen führen. So handelt sich überraschend um die Isoformen α und ϵ , die eine Translocation durch hohe Glukosekonzentrationen erfahren. Der Effekt wurde durch Aktivierung von Proteinkinase C in endothelialen Zellen vermittelt. Es wurden PKC-Isoformen α , δ , ϵ , ζ und θ aus Aorta-Endothelialzellen des Schweins identifiziert. Außerdem wurde festgestellt, daß sich der Phorbol ester TPA (12-O-Tetradecanoyl-phorbol-13-acetat), der als Aktivator von PKC bekannt ist und als "Tumor-Promotor" bezeichnet wird, weil er den Effekt von geringen Konzentrationen karzinogener Verbindungen erhöht, ähnlich dem Effekt der Glukose verhält und eine Verminderung der Durchlässigkeit bewirkt.

Gemäß der Erfindung konnten nun Antisense Oligodesoxynukleotide (ODN) gegen PKC α bereitgestellt werden, die eine Expression der Isoform reduzieren, den Effekt der Glukose, nämlich endotheliale Barrierendysfunktionen, vollständig beseitigen und den TPA-Effekt signifikant verringern.

Es handelt sich um Antisense ODN, die gegen die 3' untranslatierte Region des PKC alpha-Isoform gerichtet sind.

Bevorzugt handelt es sich um die Antisense ODN mit den folgenden Sequenzen (5'-3'), die als Phosphorothioat konditioniert vorliegen:

a) CM-pan333a TCg CAg AAg gTg ggg (Größe 15mer)

Zielsequenz: regulatorische Domäne (Position 333 HSPKCA)

b) CM-pan1502a ATC TCT ggg gCg ATA TAA TCT ggA g (25mer)

Zielsequenz: enzymatische Domäne (Position 1502 HSPKCA1)

c) CM-pan343a TgC gAT CAC TgT ggg TCA gTG CTC T (25mer)

Zielsequenz: enzymatische Domäne (Position 343 HSPKCA1)

d) ISIS 3527 gAg ACC CTg AAC AgT TgA TC (20mer)

Zielsequenz: 3'-untranslatierter Abschnitt

e) ISIS 3521 gTT CTC gCT ggT gAg TH CA (20mer)

Zielsequenz: 3'-untranslatierter Abschnitt

f) ISIS 3522 AM ACg TCA gCC ATg gTC CC (20mer)

Zielsequenz: ATG-Start-Codon

g) MA-PKCA001 gTC AgC CAT ggT CCC (15mer)

Zielsequenz: ATG-Start-Codon.

Diese Antisense ODN werden gemäß der Erfindung bevorzugt zur Verhinderung und/oder Vermeidung endothelialer Barrierendysfunktionen, vorzugsweise gegen durch hohe Glukosekonzentrationen induzierte Verminderungen der endothelialen Zelldurchlässigkeit, eingesetzt. Damit sind sie insbesondere zur Therapie und/oder Prophylaxe von Organschäden durch Hyperglykämie, z. B. bei Diabetes mellitus geeignet.

Darüber hinaus betrifft die Erfindung weitere Antisense ODN, so z. B. solche, die gegen die 3' untranslatierte Region des PKC, delta-, epsilon- und zeta-Isoform gerichtet sind.

Ein erfindungsgemäßes Antisense ODN gegen PKC-delta weist die Sequenz

Tgg Agg ACg Tgg AH gCA AAC AgT C auf.

(CM-PKCD365-Größe 25mer).

Ein bevorzugtes Antisense ODN gegen die PKC epsilon-Isoform hat die Sequenz

gCC ATT gAA CAC TAC CAT.

(CM-PKC-E, Größe 18mer, Zielsequenz: ATG-Start-Codon).

Erfindungsgemäße Antisense ODN gegen PKC zeta-Isoform sind gekennzeichnet durch die folgenden Sequenzen:

a) CM-PKCZ1756 gTc CAC gAC AgA gAC gCA CgC ggC C (25mer)

Zielsequenz: 3'UTR (Position 1756)

b) CM-PKCZ595 gTA AgC AAT TCC ATC TgT CTC CTC g (25mer)

Zielsequenz: V3-Domäne (Position 595)

c) CM-PKCZ1954 gCA CAG CAG CAA gTT CCT CCA gCA C (25mer)

Zielsequenz: 3'-UTR (Position 1954)

d) CM-PKCZ001 gCC gCT CCC TTC CAT (15mer)

Zielsequenz: Position 1-15 HSPKCA.

Alle Antisense ODN liegen Phosphorothioat-konditioniert vor.

Die erfindungsgemäßen Antisense Oligodesoxynukleotide gegen die PKC alpha-, delta-, epsilon- und zeta-Isoform

sind hervorragend gegen durch TPA induzierte Verminderungen der endothelialen Zelldurchlässigkeit geeignet, insbesondere sind die Antisense ODN gegen die PKC alpha- und epsilon-Isoform geeignet.

Gemäß der Erfindung werden sie zur Beeinflussung der Tumorangiogenese, insbesondere zur Inhibierung von Tumorwachstum verwendet.

Die Erfindung betrifft auch pharmazeutische Zubereitungen, die ein oder mehrere Antisense Oligodesoxynukleotide umfassen und gegebenenfalls mit an sich üblichen Hilfs-, Träger- und Zusatzstoffen formuliert sind.

oder mehrere Antisense Oligodesoxynukleotide nach einem der Ansprüche 1 bis 9, gegebenenfalls mit an sich üblichen Hilfs-, Träger- und Zusatzstoffen.

Patentansprüche

1. Spezifische Antisense Oligodesoxynukleotide (ODN) gegen Proteinkinase C (PKC)-Isoformen. 15
2. Antisense Oligodesoxynukleotide nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie gegen die 3' untranslatierte Region der PKC alpha-Isoform gerichtet sind.
3. Antisense Oligodesoxynukleotide nach Anspruch 2, 20 dadurch gekennzeichnet, daß sie die Sequenzen
TCg CAg AAg gTg ggg,
ATC TCT ggg gCg ATA TAA TCT ggA G,
TgC gAT CAC TgT ggg TCA gTg CTC T,
gAg ACC CTg AAC AgT TgA TC, 25
gTT CTC gCT ggT gAg TTT CA,
AAA ACg TCA gCC ATg gTC CC oder
gTC AgC CAT ggT CCC aufweisen.
4. Antisense Oligodesoxynukleotide nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie gegen die 3' untranslatierte Region des PKC delta-Isoform gerichtet sind. 30
5. Antisense Oligodesoxynukleotide nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß sie die Sequenz
Tgg Agg ACg Tgg ATT gCA AAC AgT C aufweisen.
6. Antisense Oligodesoxynukleotide nach Anspruch 1, 35 dadurch gekennzeichnet, daß sie gegen die 3' untranslatierte Region des PKC epsilon-Isoform gerichtet sind.
7. Antisense Oligodesoxynukleotide nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß sie die Sequenz 40
gCC ATT gAA CAC TAC CAT aufweisen.
8. Antisense Oligodesoxynukleotide nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie gegen die 3' untranslatierte Region des PKC zeta-Isoform gerichtet sind.
9. Antisense Oligodesoxynukleotide nach Anspruch 8, 45 dadurch gekennzeichnet, daß sie die Sequenzen
gTc CAC gAC AgA gAC gCA CgC ggC C
gTA AgC AAT TCC ATC TgT CTC CTC g
gCA CAG CAg CAA gTT CCT CCA gCA C
gCC gCT CCC TTC CAT aufweisen. 50
10. Verwendung von Antisense Oligodesoxynukleotiden nach einem der Ansprüche 1 bis 3, zur Vermeidung und/oder Behebung von endothelialen Barrierendysfunktionen vorzugsweise gegen durch hohe Glukosekonzentrationen induzierte Verminderungen der endothelialen Zelldurchlässigkeit. 55
11. Verwendung nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß sie zur Therapie und/oder Prophylaxe von Organschäden durch Hyperglykämie, z. B. bei Diabetes mellitus, eingesetzt werden. 60
12. Verwendung von Antisense Oligodesoxynukleotiden nach einem der Ansprüche 1 bis 9 gegen durch TPA induzierte endotheliale Barrierendysfunktionen.
13. Verwendung von Antisense Oligodesoxynukleotiden nach einem der Ansprüche 1 bis 9 zur Beeinflussung der Tumorangiogenese, insbesondere zur Inhibierung von Tumorwachstum. 65
14. Pharmazeutische Zubereitungen umfassend ein

- Leerseite -